

のミトコンドリアへの局在を誘導しマイトファジーを促進すると報告している。したがって、HCVがマイトファジーを誘導するの否か、HCVにより障害を受けたミトコンドリアがどのように存在し続けるのかについてはさらなる検討が必要である。いずれにしても、HCVによるROS産生のマグニチュードは決して大きいものではなく、ミトコンドリアの品質管理低下による抗酸化機構の低下や後述するHCV自身、あるいはHCV誘導性ROSによる代謝異常がさらなる酸化ストレスを増幅すると考えられる。

肝臓がんにおける酸化ストレス増幅機構としての代謝異常

臨床的にもC型肝炎には糖、脂質、鉄代謝異常などの代謝異常を合併しやすいことがよく知られているが、これらの代謝異常は酸化ストレス増強機構としてC型肝炎からの肝臓がんを考えるうえで重要な役割を担っている。

1 鉄代謝異常

鉄は酸化ストレスにおいて重要な働きをする。鉄はFenton反応を触媒して過酸化水素(H_2O_2)をヒドロキシルラジカル(OH)に転化させる。OHはROSのなかでも毒性が最も強く、DNAを切断したり、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)を蓄積して酸化的DNA障害を引き起こす。それでは、HCV感染ではどのようにして鉄代謝異常が引き起こされるのであろうか？ヘプシジン(hepcidin)は肝臓で生成、分泌されるホルモンであり、体内の鉄含有量を負に調節しているが、C型肝炎患者では血清ならびに肝のヘプシジン量が低下していることが明らかにされている。筆者らは、この点に関してHCV全遺伝子が組み込まれたTgマウス(HCV Tgマウス)を用いて、HCVにより産生されるROSがCCAAT/enhancer binding protein(CEBP)homology protein(CHOP)の発現を増強することでCEBP α のヘプシジンプロモーターへの結合が阻害され、ヘプシジンの転写が抑制されることを報告した⁸⁾。さらに、このような鉄代謝異常が真にC型肝炎がんに関連しているの否かを明らかにするためにHCV Tgマウスに軽微な鉄過剰餌を与えてC型慢性肝炎患者と同程度の肝鉄濃度にしたところ、肝脂肪化、ミトコンドリアの機能的・形態的異常を経由して肝脂質過酸化物、8-OHdGの蓄積をきたし、ついには鉄負荷12か月目に45%のマウスにおいて肝細胞がんを含む肝腫瘍を認めた⁹⁾。一方、臨

床的にはC型慢性肝炎に対する瀉血療法は肝発がんを抑制することが明らかにされている。このように、HCVによる鉄代謝障害はミトコンドリア傷害、酸化ストレス増強を介して肝発がんに関与していると考えられる。

2 インスリン抵抗性

耐糖能障害やインスリン抵抗性はC型慢性肝疾患の重要な病態の1つであるが、同時に肝発がんの重要な危険因子でもある。HCVがインスリン抵抗性を引き起こす機序として、HCV感染に起因する腫瘍壊死因子(TNF)- α がインスリン受容体基質(IRS)-1のチロシン(Tyr)残基のリン酸化を阻害してインスリンシグナルを抑制することや、コア蛋白により誘導されたSOCS3がIRS-1, 2をユビキチン化して分解し、インスリンシグナルを抑制することが報告されている。レドックスバイオロジーの観点から言えば、細胞内の酸化状態はホスファターゼ活性に対して相対的にキナーゼ活性を増強する。セリン/スレオニンキナーゼ(Ser/Thrキナーゼ)の活性化によるIRSにおけるSer/Thr残基のリン酸化は、インスリンシグナルに必要なTyr残基のリン酸化を抑制することでインスリン抵抗性を惹起することが報告されている。したがって、HCVコア蛋白によるROSは細胞内のc-Jun N-terminal kinase(JNK)といったSer/Thrキナーゼを活性化することでTNF- α がSer/Thr残基のリン酸化を促進し、結果的にTyr残基のリン酸化を抑制することでインスリン抵抗性を引き起こしていると想定される。このように、HCVによるROS産生はC型肝炎におけるインスリン抵抗性を惹起する重要な因子と考えられる。

3 脂質代謝異常

C型慢性肝炎の肝組織像の特徴として、肝脂肪化が高頻度に認められることはよく知られている。HCVが排除されると肝脂肪化が軽減あるいは消失するといった事実やHCVジェノタイプによって肝脂肪化程度が変わることはC型慢性肝炎における肝脂肪化がHCVによる直接的な作用であることを示している。コア蛋白はmicrosomal triglyceride transfer protein(MTP)活性を阻害して肝からの超低比重リポ蛋白(VLDL)分泌を抑制する。また、インスリン抵抗性は肝細胞への脂肪酸の取り込みを促進することが知られている。肝発がんとの点で興味深いのはコア蛋白がプロテアソーム活性化因子(PA)の1つで核内PAの調節因子であるPA28 γ の存在下に、脂質合成転写因子であるsterol regulatory element-binding protein(SREBP)-1c

の転写を亢進させ、コア Tg マウスと PA28 γ ノックアウト (KO) マウスを掛け合わせて作成したコア Tg/PA28 γ KO マウスでは脂肪肝も肝発がんも認められない点である。すなわち、C型肝炎における肝脂肪化と肝発がんには SREBP-1c 転写亢進ならびに PA28 γ が重要な役割を果たしていると考えられる。一方、酸化ストレスと肝脂肪化との関係について、筆者らは ROS による小胞体ストレスが SREBP-1 の転写後活性を亢進させることを明らかにした。

HCV 感染における DNA メチル化

DNA にメチル基という化学修飾がなされると遺伝子の機能に影響を及ぼすが、特に異常なメチル基が DNA に付加されると、その遺伝子は正常に機能しなくなる。このため、がん抑制遺伝子の DNA メチル化はがん発生の原因になると考えられている。Okamoto らは、ヒトがん組織で DNA メチル化異常が起きていることや C 型慢性肝炎組織でもメチル化異常が起きていることを発見し、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスにおいて、感染後の時間経過に伴って DNA の異常なメチル化が誘導されることを明らかにした¹⁰⁾。HCV 感染後には host で免疫応答が起こるため、免疫応答に関する遺伝子を解析したところ、このマウスではインターフェロン (IFN)- γ がマウスの肝臓で著明に誘導されていた。IFN- γ はナチュラルキラー (NK) 細胞からも産生されるが、この NK 細胞の活性を抑制する抗アシアロ GM₁ 抗体をマウスに投与したところ、IFN- γ の発現が抑制されるとともに DNA の異常なメチル化も抑制されていた。また、IFN- γ は ROS を誘導するが、HCV 感染ヒト肝細胞キメラマウスの肝臓では ROS が誘導されていた。さらに、抗アシアロ GM₁ 抗体の投与で ROS の産生も抑制されていた。この報告により、HCV によって生じる NK 細胞の活性化と IFN の持続的な発現上昇および ROS の産生が DNA メチル化異常の原因であることが示唆された (図 2、図 3)。

今後の展望

IFN を使用しない抗ウイルス療法が今年からいよいよ開始できる見込みとなり、HCV を排除できる可能性がますます高くなると考えられる。しかしながら、HCV により惹起された酸化ストレスや DNA 障害は HCV 排除により完全に消失しうる

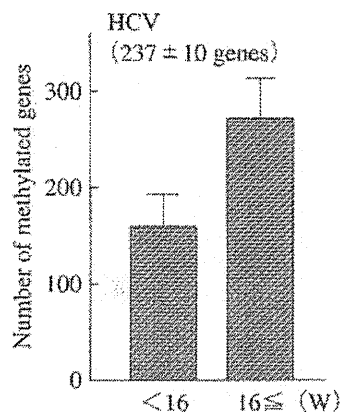


図2 ヒト幹細胞キメラマウスにおける HCV 感染後のメチル化異常の蓄積

[Okamoto Y, Gastroenterology 2014 ; 146 : 562-572 より改変]

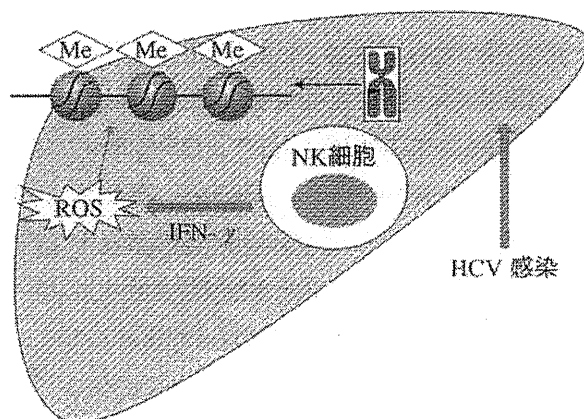


図3 HCV 感染により誘導される IFN- γ や ROS が異常メチル化蓄積の原因となる

か否かは未だ不明であり、今後の重要な課題である。HCV 排除によって C 型肝炎がんの発がんリスクは低下するが、HCV 排除後の肝がん抑制も含めた多面的な肝がん機序の解明と発がん抑制のための標的分子の解明が待たれる。

文献

- 1) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al. : Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 2001 ; 11 : 4365-4370
- 2) Okuda M, Li K, Beard MR, et al. : Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002 ; 122 : 366-375
- 3) Korenaga M, Wang T, Li Y, et al. : Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 37481-37488
- 4) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H, et al. : Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 2009 ; 50 : 378-376
- 5) Li Y, Boehning DF, Qian T, et al. : Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB J* 2007 ; 21 : 2475-2485
- 6) Barbo G, Di Lorenzo G, Asti A, et al. Hepatocellular mitochondrial alterations in patients with chronic hepatitis C : ultrastructural and biochemical findings. *Am J gastroenterol* 1999 ; 94 : 2198-2205
- 7) Kim SJ, Syed GH, Siddiqui A : Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent mitophagy. *PLoS Pathog* 2013 ; 9 : e1003285
- 8) Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al. : Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 2008 ; 134 : 226-238
- 9) Furutani T, Hino K, Okuda M, et al. : Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 2087-2098
- 10) Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, et al. : Hepatitis virus infection affects DNA methylation in mice with humanized livers. *Gastroenterology* 2014 ; 146 : 562-572

その他の肝疾患編：金属代謝異常による肝疾患

1 ヘモクロマトーシス

要点

- 異常に増加した鉄が諸臓器の実質細胞に過剰に沈着し、その結果、臓器障害をもたらす病気がヘモクロマトーシスである。ヘモクロマトーシスによって生じる古典的な臨床三徴候として、肝硬変、糖尿病、皮膚色素沈着が有名である。
- ヘモクロマトーシスは遺伝性(原発性)と二次性(続発性)に分けられる。HHは、臨床的、生化学的および遺伝子的な特徴に基づき5つのタイプに分類されている。
- 体内の鉄過剰状態を把握するために用いる血液生化学検査項目としては、血清鉄濃度、UIBC、TIBC、トランスフェリン飽和度、血清フェリチンである。
- ヘモクロマトーシスに対する治療法としては、瀉血療法(除鉄療法)、鉄制限食および鉄キレート療法がある。鉄キレート薬としては1962年にDFOが登場したが、半減期が数分と極めて短いため持続皮下注射が必要である。その後開発されたDFXは経口活性型であり、現在日本でも輸血後鉄過剰症に対して認可されている。

はじめに

鉄は造血をはじめ人間にとって重要な金属であるが、過剰に存在すると酸化ストレスを引き起こし、重篤な臓器障害や発癌を引き起こすため、生体内で鉄は厳密に制御されている。しかし、何ら

かの原因によってこの調節機構が崩れ、異常に増加した鉄が諸臓器の実質細胞に過剰に沈着し、その結果臓器障害をもたらす病気がヘモクロマトーシス(hemochromatosis)である。ヘモクロマトーシスによって生じる古典的な臨床三徴候として、肝硬変、糖尿病、皮膚色素沈着が有名である。

その成因から大きく原発性と続発性に分けられる。原発性ヘモクロマトーシスとはほとんどが、生体内の鉄代謝に関与する各種の遺伝子の異常に基づく遺伝性ヘモクロマトーシス(hereditary hemochromatosis: HH)とされ、欧米では多いが日本においてはまれである。また続発性ヘモクロマトーシスとは、例えば頻回で大量の赤血球輸血に起因する輸血後鉄過剰症や、大量飲酒などに伴う二次的な鉄過剰吸収などが原因となって引き起こされるものを指す。

本項では、わが国におけるヘモクロマトーシスの原因・背景、診断および治療について述べる。

I ヘモクロマトーシスの原因・背景・臨床的特徴

1 遺伝性(原発性)ヘモクロマトーシス

HHとは、体内への鉄吸収の増加により多臓器への障害(例えば肝硬変、肝臓、糖尿病、関節炎、心筋症、性腺機能低下症)をもたらすことが特徴的である疾患である。HHを有する患者の多くには、臨床的、生化学的および遺伝子的な特徴に基づき5つのタイプに分類されている。

古典型ヘモクロマトーシス(1型HH)は、染色体6p21.3上にあるHFE遺伝子の変異によって引き起こされる。それ以外の原発性ヘモクロマトーシスとしては、低頻度ながら後述の4つの型が存在する。2型HHは若年性ヘモクロマトーシス(juvenile hemochromatosis: JH)ともいわれているが、その中でも2つの型に分類される。2A型JH(染色体1q21の上でヘモジュベリン(hemojuvelin: HJV)遺伝子における変異に起因する)、2B型JH(染色体19q13の上のhepcidin antimicrobial peptide (HAMP)遺伝子における変異に起因する)。3型HHは染色体7q22上に存在するトランスフェリン受容体(transferrin receptor: TFR)2遺伝子の変異により、また4型HHは染色体2q32上に存在するSLC40A1遺伝子の変異により引き起こされる。

a. 1型HH(古典的ヘモクロマトーシス, HFE関連HH)

HFE関連性のHHは1型に分類されるが、これは最も頻度の高い型であり、北ヨーロッパの集団で最も高頻度の常染色体劣性疾患である。HFE遺伝子は6つのエクソンによって構成され、主要組織適合性クラスI様蛋白質に類似した膜蛋白質をコードする。世界的にはFederらによって最初に2つのHFE遺伝子変異としてC282YとH63Dが報告されたが、わが国におけるHFE遺伝子変異としてはC282Yホモ接合体保有者が九州在住のヘモクロマトーシス患者で報告されている²⁾。

HHの病態メカニズムとして近年、肝細胞で合成・分泌されるヘプシジン(hepcidin)というペプチドホルモンが同定された。ヘプシジンは、十二指腸および網内系マクロファージにおける鉄排出輸送体であるフェロポルチン(ferroportin: FPN)の変性を介した鉄吸収抑制に影響を及ぼすが、HFE蛋白がこのヘプシジンの転写を調節しているということがわかった。さらに、マウスや患者におけるHFEの機能的欠損により、ヘプシジン合成が低下することが報告された。HFE発現の欠損によりヘプシジンの重要な調節因子であ

るbone morphogenetic protein (BMP)6によるシグナル伝達経路の抑制と関連することが、*in vitro*および*in vivo*の実験で示された。以上よりHFE関連HHに、BMP6を介したヘプシジン転写調節障害が関連していることが証明された。

b. 2型HH(若年性ヘモクロマトーシス(JH))

JHはHHの2型に分類されるが、これは常染色体劣性遺伝形式を示し、30歳までに通常、心筋症、性腺機能低下症、肝障害と内分泌機能不全といった臓器障害を引き起こす。2A型および2B型のHHは、それぞれHJVおよびHAMP遺伝子における変異に起因している。

HJV遺伝子における745G>C[D249H]、934C>T[Q312X]、515_6insC[D172fsX196]²⁾の3つの変異が報告されている。またHAMP遺伝子の変異については、2012年にR75Xが初めて発見されたが³⁾、わが国ではまれである。

HAMP遺伝子は3つのエクソンによって構成され、ヘプシジン蛋白をコードしている。

HJV遺伝子(4つのエクソンによって構成される)は2004年に特定され、HJVと呼ばれる蛋白質をコードする。2A型JHの患者やHJVノックアウトマウスにおいてヘプシジン発現が低下していたことから、肝細胞膜におけるHJVの発現はヘプシジンの発現調節に関与していることが証明された。同様に、JHの場合のようにHJV発現の低下は、ヘプシジン発現低下に影響を及ぼすことがわかった。

過去の研究により、HJVはBMPの共受容体として作用し、SMADシグナル伝達経路を介してヘプシジンの発現を調節しているということが明らかにされた。

BMP6依存性のシグナル伝達経路は、ヘプシジンの発現調節において重要な役割を果たしている。BMP6は、I型およびII型セリンスレオニンキナーゼ受容体と結合し、細胞内のSMAD1/5/8蛋白を特異的にリン酸化する。リン酸化型SMAD1/5/8(P-SMAD1/5/8)が共通のメディエーターであるSMAD4と結合しSMAD複合体が形成されると核内に移行して、

標的遺伝子である HAMP の転写に影響を及ぼす。SMAD1/5/8 のリン酸化については、BMP6 により制御を受けている。マウスの肝臓において、BMP6 のリガンド、BMP 共受容体である HJV、もしくは SMAD4 をコードする遺伝子の変異によるシグナル伝達に障害を起こすと、肝内のヘプシジン発現は低下しその結果鉄過剰を引き起こす。

以上よりこれらのデータにより、BMP-SMAD シグナルはヘプシジン発現調節やそれによる鉄代謝調節機構に重要な経路であることが明らかにされた。

c. 3 型 HH (TFR2 関連 HH)

3 型 HH は、TFR2 遺伝子の変異に起因する常染色体劣性疾患であり、鉄過剰の表現型が HFE 関連 HH と類似している。TFR2 遺伝子は 18 個のエキソンで構成されており、TFR2 の蛋白をコードしている。

わが国で初めて確認された非 HFE 関連性 HH は、TFR2 遺伝子の AVAQ594-597 の欠失 (AVAQ594-597 del) であるが、この変異はわが国以外においても認められている世界的な変異である。その他、世界的に TFR2 遺伝子変異型として、E60X、M172K、Y250X 等が報告されている。

TFR2 は、肝細胞内へのトランスフェリン結合鉄の取り込みと関係しており、またヘプシジンの合成にも関与している。TFR2 がヘプシジンの発現調節に関連していることを示す根拠の 1 つとしては、TFR2 は HFE との複合体を形成したうえで、ヘプシジン発現を亢進させる BMP6/SMAD シグナルに作用を及ぼすということである。もう一つの根拠としては、TFR2 は HFE との相互作用で鉄感知複合体を形成することができ、血中の diferric transferrin 濃度に反応してヘプシジンの発現を調整するということである。TFR2 関連 HH の動物モデルもしくは患者のいずれにおいても、肝臓内のヘプシジン発現が低下していることが証明されている。

d. 4 型 HH (FPN 関連 HH, フェロポルチン病)

4 型の HH は常染色体優性遺伝形式の疾患であ

り、SLC40A1 遺伝子の突然変異が原因とされる。本遺伝子病は、世界中の様々な人種において認められる鉄過剰症である。SLC40A1 遺伝子は 8 つのエキソンによって構成され、十二指腸および網内系マクロファージに存在しており細胞外へ鉄を排出する FPN と呼ばれている膜輸送体をコードする。本疾患はフェロポルチン病ともいわれている。本疾患においては、A117G ヘテロ接合型変異、1467A>C (R489S) ヘテロ接合型変異、D157A ヘテロ接合型変異が確認されている。

本疾患ではヘプシジンの発現は保たれていることがわかっており、そのためヘプシジンとの相互作用による FPN の変性が障害を受けるために鉄を排出することができないマクロファージ内への鉄保持が進むことが、本疾患における鉄過剰の重要な機序であるとされる。

2 続発性 (二次性) ヘモクロマトーシス

続発性ヘモクロマトーシスとは、大量輸血、鉄剤・食事鉄の過剰摂取、無効造血、アルコール多飲、肝硬変などの原因によって引き起こされた鉄過剰症に伴う臓器障害の総称である。続発性ヘモクロマトーシスの原因となる疾患を表 1 に示した。

II ヘモクロマトーシスを診断するための生化学的検査法

体内の鉄過剰状態を把握するために用いる血液生化学検査項目としては、血清鉄濃度、不飽和鉄結合能 (unsaturated iron-binding capacity: UIBC)、総鉄結合能 (total iron-binding capacity: TIBC=UIBC+血清鉄濃度)、トランスフェリン飽和度 [transferrin saturation: TS(%) = $\text{Fe}/\text{TIBC} \times 100$]、血清フェリチンである。血清フェリチン値は HH における鉄過剰状態を鋭敏に示す検査項目であるが、特異度は低く、炎症反応、糖尿病、飲酒等によっても上昇する。血清フェリチンが 1,000 ng/mL を超えた場合に臓器障害を引き起こすリスクが高まることが示唆されている報告⁴⁾や、血清フェリチン 2,500 ng/mL を超える

と心イベントの発生率が高まるという報告がある⁵⁾。遺伝子異常によって引き起こされる鉄過剰症を有する患者のTS%値は、通常女性では50%以上、男性では60%以上であるとの報告がある。そのため鉄過剰状態が疑われる患者は、空腹時の血清フェリチンやTS%値を主として評価すべきである。

III ヘモクロマトーシスに対する治療法

ヘモクロマトーシスは、進行すれば臓器障害が不可逆的となるため、早期に診断し治療を開始することが必要である。

1 瀉血療法(除鉄療法)

瀉血とは、血液を抜いて体外に廃棄する治療法であり、除鉄療法ともいわれている。血液中には、主に鉄含有蛋白であるヘモグロビン鉄を豊富に含む赤血球があり、この血液は100mLあたり約50mgの鉄が含まれるので、1回の瀉血量が200mLであれば100mgの鉄が、400mLであれば200mgの鉄が体内から除去されることになる。瀉血を行うと貧血傾向に働くが、それに対し体は鉄を利用したヘモグロビン合成を伴う赤血球造血が亢進する。その際、肝臓や骨髄等の網内系における貯蔵鉄が利用されるようになるため、肝臓で組織障害性に働いている鉄を減少させ、肝障害を改善させることができる。

2 鉄制限食

前述の瀉血療法を行い赤血球造血亢進により網内系の鉄利用が亢進すれば、それに呼応して十二指腸からの鉄吸収も亢進する傾向となる。そのため、瀉血後の反応性に高まる鉄吸収状態への対応として、鉄制限食の併用も重要であるとされる。

3 鉄キレート療法

鉄キレート薬は1962年にデフェロキサミン(deferoxamine: DFO)が登場し、鉄過剰症の治療は飛躍的に進歩した。DFOは6座配位の鉄キレート薬であり、 Fe^{3+} と1:1で結合し安定化した錯体を形成する。しかし、腸からの吸収はわずかであり、尿中と便中に速やかに排泄される。

表1 続発性(二次性)ヘモクロマトーシスの原因疾患

遺伝性：重症型サラセミア、遺伝性鉄芽球性貧血、遺伝性溶血性貧血、先天性無トランスフェリン血症など 後天性：頻回な輸血、鉄剤過剰投与、後天性鉄芽球性貧血、晩発性皮膚ポルフィリン症など

そのため、DFOは高い鉄除去能を有するが、半減期が数分と極めて短い。シリンジポンプを用いて1日8~12時間の持続皮下注射を1週間に5日以上も行わなければならない。患者への負担が大きい。そのためアドヒアランス向上のため、経口の鉄キレート薬の開発が望まれていた。DFOの副作用としては、皮膚障害、聴力障害、視力障害等が報告されている。

その後、日本でも輸血後鉄過剰症に対して認可されたデフェラシロクス(deferasirox: DFX)が開発された。DFXは経口活性型であり、 Fe^{3+} に対して高い選択性を示す3座キレート薬である。 Fe^{3+} と2:1で結合し、便中に排泄される。半減期が8~16時間と長いため、1日1回の投与で効果が期待でき、非トランスフェリン結合鉄(non-transferrin bound iron: NTBI)を減少させ、実質細胞への鉄取り込みを減少させることができる。加えて、DFX投与後に患者の血清鉄値が一時的に上昇することが臨床的に報告されている。これはDFXに取り込まれた鉄を血清鉄として測定している可能性が高く、そのため臨床的にはDFXの投与は継続しても問題ないとされている。DFXの一般的な開始量は20mg/kgであるが、個々の患者および病態により増減可能である。

鉄過剰状態では余剰な鉄が骨髄に蓄積し、血球のアポトーシスを誘導するといわれている。有効な除鉄効果が得られ、長期にキレート療法を継続した場合は、造血能の回復につながる可能性が指摘されている。このことは、診断時に既に鉄過剰状態を呈している骨髄異形成症候群の患者にDFXを投与すると、血球減少が回復するという報告からも裏付けられる。

まとめ

ヘモクロマトーシスを含む鉄過剰症の治療は、DFXの登場で飛躍的な進歩をとげている。DFXは継続的な経口投与が可能であるため、アドヒアランスもよい。また、DFXは除鉄のみならず、臓器障害としての原疾患治療にも有効である可能性がある。現在わが国では、DFXは輸血後鉄過剰症にのみ保険認可されているが、今後は様々な鉄過剰症をきたす疾患への適応拡大が期待される場所である。

(内科総論・日野啓輔)

文献

- 1) Sobda T, Okubo R, Kamimura S, et al : Hemochromatosis with HFE gene mutation in a Japanese patient. *Am J Gastroenterol* 96 : 2487-2488, 2001
- 2) Macda T, Nakamaki T, Saito B, et al : Hemojuvelin hemochromatosis receiving iron chelation therapy with deferasirox : improvement of liver disease activity, cardiac and hematological function. *Eur J Haematol* 87 : 467-469, 2011
- 3) Hattori A, Tomosugi N, Tatsumi Y, et al : Identification of a novel mutation in the HAMP gene that causes non-detectable hepcidin molecule in a Japanese male patient with juvenile hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis* 48 : 179-182, 2012
- 4) Takatoku M, Uchiyama T, Okamoto S, et al : Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload on morbidity/mortality. *Eur J Haematol* 78 : 187-194, 2007
- 5) Olivieri NF, Nathan DG, MacMillan JH, et al : Survival in medically treated patients with homozygous beta-thalassemia. *N Engl J Med* 331 : 571-578, 1994

IV C型肝炎を理解するための最前線研究のトピックス

12 酸化ストレス

要点

- HCV 蛋白のうちコア蛋白、NS5A が細胞内で酸化ストレスを引き起こすとされている。特に HCV コア蛋白はミトコンドリア電子伝達系を傷害し ROS を産生する。
- コア蛋白によるミトコンドリア由来の ROS は鉄代謝異常、脂質代謝異常、インスリン抵抗性などを引き起こし、C型肝炎の病態形成と密接に関わっている。

はじめに

C型肝炎ウイルス (hepatitis C virus: HCV) は、いまだにわが国の肝細胞癌の原因の大半を占めている。その病態についてはまだまだ不明な点が多いが、病態進展の要因の一つに酸化ストレスが大きく関与していると考えられている。*in vitro*, *in vivo* の検討から HCV コア蛋白はミトコンドリアの電子伝達系の複合体の活性を阻害し、ミトコンドリア由来の活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) を産生することが明らかとなっている¹⁾。一方 C型肝炎患者では肝内の鉄の蓄積や、肝脂肪化、インスリン抵抗性といった病態が特徴的であり、これらの代謝異常は HCV 関連の肝発癌に関連し、HCV が誘導する酸化ストレスと密接に関わっている。

本項では HCV による酸化ストレス誘導機序について考察するとともに、酸化ストレスがどのように C型肝炎に特徴的な代謝異常と病態形成に関与しているのかを解説する。

I HCV とミトコンドリア

1 酸化ストレスとミトコンドリア

ミトコンドリア膜上の電子伝達系は複合体 I から V に分類されている。電子伝達系ではクエン酸回路で産生された NADPH やコハク酸が酸化され電子が放出される。放出された電子は内膜に存在する複合体間へ伝達される。正常時には複合体間を移動する電子が酸素分子と直接反応してスーパーオキシド ($\cdot O_2^-$) が生じる量は少ない。しかし、ミトコンドリア膜の変化や、電子の流れが阻害されると電子が電子伝達系から漏出し、酸素を一電子還元して $\cdot O_2^-$ を発生する。

一方細胞内には ROS を消去するシステムも同時に備わっている。manganese superoxide dismutase (MnSOD) は $\cdot O_2^-$ を H_2O_2 と酸素にして消去する。この H_2O_2 はミトコンドリアのマトリックスに存在する glutathione (GSII) によりさらに H_2O へと変化する。またその他の H_2O_2 はチオレドキシン、ペルオキシレドキシンを介して消去されたり、残りはミトコンドリア内に拡散したりするものもある。

2 HCV コア蛋白のミトコンドリアとの相互作用と ROS の産生

細胞内コア蛋白の局在については、コア蛋白は小胞体 (endoplasmic reticulum: ER)、脂肪滴、ミトコンドリアに結合する形で細胞質に存在して

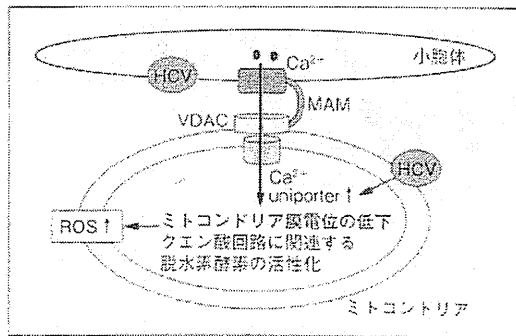


図1 HCV コア蛋白による酸化ストレス発生機序
 VDAC: voltage dependent anion channel
 MAM: mitochondria-associated membrane

いと、複数のグループが報告している^{17,18}。電子顕微鏡を用いた検討では HCV コア蛋白がミトコンドリア内膜に局在することも報告されている¹⁷。また Schwer らは HCV コア蛋白が小胞体とミトコンドリアが結合した場所である mitochondria-associated membrane (MAM) と結合していることを報告した¹⁹。こうした HCV コア蛋白とミトコンドリアとの直接的な結合はミトコンドリアの ROS の産生あるいは消去系に影響を及ぼし、酸化ストレスを誘導する可能性を示唆するものと考えられる。

Korenaga ら¹⁸は、HCV 構造蛋白を発現するトランスジェニックマウスの肝ミトコンドリア分画において、複合体 I の活性が低下していることを明らかにした。また Tsutsumi らはミトコンドリアのプロテオミクス解析から、シャペロン蛋白である prohibitin とミトコンドリア DNA でコードされる電子伝達系複合体 IV (cytochrome oxidase: COX) のサブユニットとの interaction がコア蛋白により阻害されることで COX の活性が低下することを報告している²⁰。さらに HCV コア遺伝子導入トランスジェニックマウスでは肝炎の組織所見は認めないにもかかわらず GSH の低下を認めることが報告されている²¹。

③ HCV によるカルシウムシグナルの調節とミトコンドリア ROS 産生

前述のようにミトコンドリアと小胞体は MAM を介して結合しているために、小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} 輸送を効果的に行うことができる。この Ca^{2+} 輸送の調節に HCV が関与することで ROS の産生を促すという報告がなされている。

さらには、HCV コア蛋白がミトコンドリア内膜に存在する Ca^{2+} uniporter と呼ばれるカルシウム選択的イオンチャネルによるカルシウムの取込みを促進させることを明らかにしている²²。ミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇することで、ミトコンドリア膜電位の低下、mitochondrial permeability transition (MPT) が引き起こされ、ミトコンドリア内の ROS が増加することが示されている。ミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇するとクエン酸回路の多くの脱水素酵発が活性化されることが知られており、電子伝達系への電子供与が促進されて ROS 産生促進の一因ともなり得る。しかし、コア蛋白が直接的にミトコンドリア内膜上の Ca^{2+} uniporter に影響を及ぼすとは考えにくく、一方でカルシウムはミトコンドリア外膜に存在する voltage dependent anion channel (VDAC) を介して流入し、VDAC は Ca^{2+} uniporter と一種の複合体を形成してミトコンドリアへカルシウムを取り込むと考えられている(図1)。したがって HCV コア蛋白が、何らかの機序により Ca^{2+} uniporter を活性化してミトコンドリアへのカルシウムの取込みを促進していると思われるが、この点については今後の検討が必要である。

NS5A も酸化ストレスを引き起こすことが明らかにされているが、その機序として小胞体からのミトコンドリアへの Ca^{2+} を誘導し、ミトコンドリアでの ROS 産生を増加させると報告されている²³。

④ ミトコンドリアの品質管理と HCV

細胞内の小器官にはその小器官を品質管理する

機構が存在するが、ミトコンドリアも例外ではない。ここまで述べたように HCV の存在下では酸化ストレスの亢進、ミトコンドリアの膜電位の低下などが認められミトコンドリア障害が存在すると思われるが、品質管理機構が存在するにもかかわらず、なぜこのような品質の低下したミトコンドリアが細胞内に存在し続けるのであろうか？ われわれは HCV により障害を受けたミトコンドリアが除去されなければ、継続的に酸化ストレスを引き起こす原因になるのではないかという仮説のもとにメンテナンス機構の一つであるマイトファジー（シモ参照）に注目し検討を行った。その結果、われわれは HCV コア蛋白がマイトファジーの制御に重要なユビキチン結合酵素である Parkin と結合し Parkin のミトコンドリアへの局在を抑制することで、マイトファジーを抑制することを見出した (Hara et al 論文投稿中)。一方でわれわれと全く逆の知見も存在する。Siddiqui ら¹¹⁾ は HCV 蛋白が Parkin のミトコンドリアへの局在を誘導しマイトファジーを促進すると報告した。さらに薬物によるマイトファジーの抑制あるいは Parkin のノックアウトにより HCV により活性の低下した複合体 I の機能が回復すると報告している。両者の実験モデルの違いなど異なる結果についてはさまざまな要因が考えられるが、HCV がマイトファジーを誘導するのか否か、どのように HCV により酸化ストレスが持続するのかは更なる検討が必要であると考えている。

Memo マイトファジー

マイトファジーとは機能が低下したミトコンドリアを、選択的に二重膜によって隔離しオートファジー経路で分解する機構であり、ミトコンドリアの品質管理を行うと考えられている。マイトファジーではミトコンドリア膜電位の低下が initial signal となつて、キナーゼである PTEN-induced kinase 1 (PINK 1) がユビキチン結合酵素 Parkin をリン酸化する。その後 Parkin がミトコンドリア外膜へ移動し、ミトコンドリアの膜に隔離膜が形成され、内容物であるミトコンドリアが除去される。

II HCV による ROS の産生がもたらす代謝異常

1 HCV と鉄代謝

C 型慢性肝炎において鉄関連血清マーカーの上昇や肝内の鉄沈着の増加は肝炎の程度や線維化の程度と比較的よく相関する。鉄は Fenton 反応によりヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) を大量に発生させるが、 $\cdot\text{OH}$ は ROS の中でも毒性が最も強く DNA を切断したり 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8-OHdG) の蓄積を惹起し酸化 DNA 障害を引き起こす。

鉄は十二指腸粘膜上皮からの鉄吸収および網内系からの鉄放出により厳密に調節されている。肝臓で生成、分泌されるペプチドホルモンであるヘプシジンは、腸管からの鉄の吸収や網内系のマクロファージからの放出をコントロールする。

われわれは HCV の全遺伝子を発現するトランスジェニックマウス (HCV TgM) を用いて肝内ヘプシジンの mRNA 量がコントロールマウスに比べて有意に低く、これに対して十二指腸、脾臓でのフェロポーチンの発現が有意に高いことを報告した¹²⁾。さらに HCV TgM の初代培養肝細胞を用いてヘプシジンの発現低下時期に一致したプロモーターの活性低下を明らかにした。その機序として ROS 産生に伴う CCAAT/enhancer binding protein (CEBP) homology protein (CHOP) の発現亢進により、C-EBP α のヘプシジンプロモーターへの結合が抑制されることが明らかになった。同様に ROS 産生亢進によりヘプシジンの転写が抑制されるとした報告もなされている。この報告によると ROS により histone deacetylase (HDAC) の活性が亢進して転写因子である C-EBP α や signal transduction and activator of transcription (STAT) 3 のヘプシジンプロモーター領域への結合力が低下するだけでなく HIF の安定化や C-EBP α の DNA 結合低下も引き起こす¹³⁾。このように HCV コア蛋白が誘導したミトコンドリアからの ROS はヘプシジンの転写抑制を介して肝内

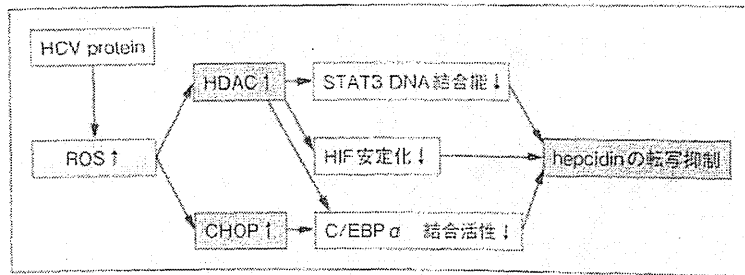


図2 HCVが誘導するROSによるhepcidinの転写抑制機構

HDAC: histone deacetylase
 CHP: C/EBP homology protein
 STAT3: signal transduction and activator of Transcription 3
 HIF: hypoxia-inducible factor
 C/EBP α : CCAAT/enhancer binding protein α

に鉄を蓄積させる(図2)。

2 HCVとインスリン抵抗性

C型慢性肝炎において2型の糖尿病も重要な病態の一つである。HCVが促進するインスリン抵抗性のメカニズムは完全には解明されていないが、HCVが直接的にインスリン抵抗性を誘導することが、いくつか報告されている。HCVコア蛋白存在下ではインスリンシグナルを伝達するinsulin receptor substrates (IRS) 1と2の発現は低下しており、この理由としてIRS1,2がユビキチン化されプロテアソームで分解されるためと考えられている。suppressor cytokine signal (SOCS)3は蛋白のユビキチン化に関与しているが、HCVコア蛋白はこのSOCS3の発現を増強させることでIRS1,2のユビキチン化を促進させると考えられている¹⁴。SOCS3はまたIRS1のチロシンのリン酸化も抑制する。このようにインスリンシグナルにおいてIRS1のチロシンリン酸化は重要なシグナル開始のスイッチであるが、HCVコア蛋白によるミトコンドリア由来のROSはJNK1といったSer/Thrキナーゼを活性化しIRS1のチロシンリン酸化を抑制する可能性が考えられる。肝のインスリン抵抗性によりインスリンのクリアランスが低下すると同時に膵臓の β 細胞からのインスリンの分泌が増加する。このことが高インスリン血症や身体のインスリン感受性を低下させる。

3 HCVと肝脂肪化

C型慢性肝炎の肝組織特徴として肝脂肪化が高頻度に認められることはよく知られている。

HCVが排除されると肝脂肪化が軽減あるいは消失するといった事実やHCV genotype 3a感染者は肝脂肪化の傾向が強いことはC型慢性肝炎における肝脂肪化がHCVによる直接的な作用であることを示している。またHCV側から肝脂肪化を考えるとHCVの形成に脂肪滴が重要な働きをしていることが報告されており¹⁵、このことはHCVの持続感染に必要な代謝障害と考えることができる。

a. 脂肪分解抑制

脂肪酸はミトコンドリアにおいて β 酸化により分解される。われわれは肝脂肪化をきたす鉄負荷HCV TgMにおいて β 酸化が抑制され、 β 酸化の律速酵素であるcarnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1)の発現が低下していることを報告した¹⁶。

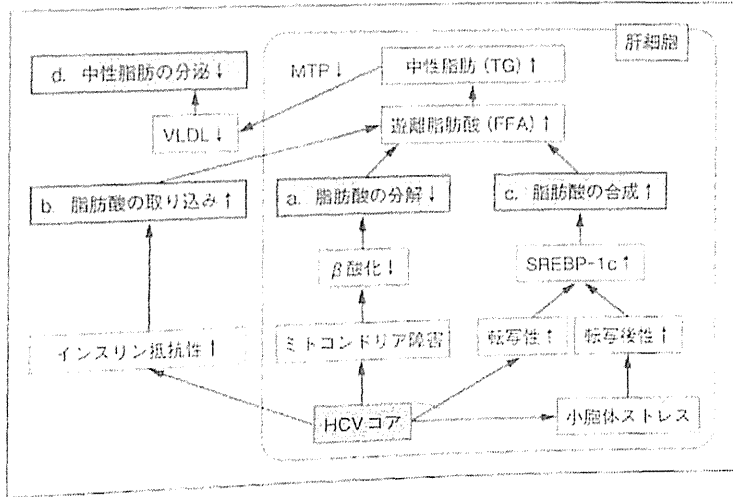
b. 脂肪酸取り込み抑制

前述のようにHCV感染者はインスリン抵抗性をきたすが、このようなインスリン抵抗性は高インスリン血症を引き起こし、肝への遊離脂肪酸の取り込みを促進させる。

c. 脂肪酸合成の促進

脂肪酸合成経路に関わる酵素群を転写する転写因子であるSREBP1cは肝臓に多く発現しており、脂肪酸・中性脂肪合成に関わる遺伝子群を制御している。このSREBP1cの転写調節にはliver X receptor α (LXR α)、retinoid X receptor- α (RXR α)などの核内受容体に関与し、通常は脂質のligandとの結合により核内受容体型転写因子は活性化される。しかし、HCVコア蛋白はLXR α やRXR α のSREBP1cプロモーターへの結合を非ligand依存性に、proteasome activator

図3 コア蛋白による肝脂肪化の機序



の一つで核内 proteasome の調節因子である PA28γ の存在下に増強することが報告されている。

通常状態では SREBP1c は SREBP cleavage-acting protein (SCAP) と結合して小胞体に局在するが、小胞体ストレス下ではこの複合体はゴルジ装置へ translocation し、SREBP は SCAP と離れて核へ移行する。前述の鉄を負荷した HCV TgM では著明な肝脂肪化を認め、酸化ストレスにより小胞体ストレス関連分子 (p112a, spliced XBP1, CHOP) の発現が亢進し、SREBP-1 の転写後活性化を認めたり。すなわち、コア蛋白は脂質合成を止に制御する転写因子である SREBP-1c を転写性ならびに転写後性に活性化すると考えられる。

d. HCV 感染者の肝組織

VLDL を形成するのに必要な microsomal tri-glyceride transfer protein (MTP) が減少しており、HCV コア遺伝子導入トランスジェニックマウスでは、MTP 活性低下によって VLDL として中性脂肪が分泌されることが抑制される (図3)。

おわりに

direct-acting antivirals (DAAs) などの開発により抗ウイルス療法が飛躍的に進歩し、大半の HCV 感染者から HCV の排除ができる時代を迎えようとしている。HCV の排除は酸化ストレス

の主要な発生源の消失を意味し、最も有効な治療であるものの、高齢者が C 型肝炎患者の多数を占めるわが国においては必ずしも容易ではなく、HCV を排除したとしてもその後の発癌をきたす例がしばしば見受けられる。今後は HCV を排除することのみに焦点を当ててではなく、HCV 感染が酸化ストレスに関連した代謝性疾患であるという一面も考慮して C 型肝炎の病態を理解し、より多角的な治療戦略を構築することが重要と考えられる。

(原 裕一・日野啓輔)

文献

- 1) Moriya K, Fujie H, Shintani Y, et al.: The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1: 1065-1067, 1998
- 2) Moriya K, Nakagawa K, Santa T, et al.: Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 11: 4365-4370, 2001
- 3) Okuda M, Li K, Beard MR et al.: Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 122: 366-375, 2002
- 1) Korenaga M, Wang T, Li Y et al.: Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 280: 37481-37488, 2005

IV C型肝炎を理解するための最新研究のトピックス

- 5) Schwer B, Ren S, Pietschmann T et al : Targeting of hepatitis C virus core protein to mitochondria through a novel C-terminal localization motif. *J Virol* 78 : 7958-7968, 2004
- 6) Aizaki H, Morikawa K, Fukasawa M et al : Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *J Virol* 82 : 5715-5724, 2008
- 7) Chu VC, Bhattacharya S, Nomoto A et al : Persistent expression of hepatitis C virus non-structural proteins leads to increased autophagy and mitochondrial injury in human hepatoma cells. *PLoS One* 6 : e28551, 2011
- 8) Tsutsumi T, Matsuda M, Aizaki H et al : Proteomics analysis of mitochondrial proteins reveals overexpression of a mitochondrial protein chaperon, prohibitin, in cells expressing hepatitis C virus core protein. *Hepatology* 50 : 378-386, 2009
- 9) Li Y, Boehning DF, Qian T et al : Hepatitis C virus core protein increases mitochondrial ROS production by stimulation of Ca²⁺ uniporter activity. *FASEB J* 21 : 2475-2485, 2007
- 10) Gong G, Waris G, Tanveer R et al : Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 9599-9604, 2001
- 11) Kim SJ, Syed GH, Siddiqui A : Hepatitis C virus induces the mitochondrial translocation of Parkin and subsequent autophagy. *PLoS Pathog* 9 : e1003285, 2013
- 12) Nishina S, Hino K, Korenaga M, et al : Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology* 134 : 226-238, 2008
- 13) Miura K, Taura K, Kodama Y, et al : Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology* 48 : 1420-1429, 2008
- 14) Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M et al : Hepatitis C virus down-regulates insulin receptor substrates 1 and 2 through up-regulation of suppressor of cytokine signaling 3. *Am J Pathol* 165 : 1499-1508, 2004
- 15) Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, et al : The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9 : 1089-1097, 2007
- 16) Nishina S, Korenaga M, Hidaka I et al : Hepatitis C virus protein and iron overload induce hepatic steatosis through the unfolded protein response in mice. *Liver Int* 30 : 683-92, 2010
- 17) Morishi K, Mochizuki R, Moriya K et al : Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *PNAS* 104 : 1661-1666, 2007

Original Article

Blood neutrophil to lymphocyte ratio as a predictor in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with hepatic arterial infusion chemotherapy

Takeshi Terashima, Tatsuya Yamashita, Noriho Iida, Taro Yamashita, Hidetoshi Nakagawa, Kuniaki Arai, Kazuya Kitamura, Takashi Kagaya, Yoshio Sakai, Eishiro Mizukoshi, Masao Honda and Shuichi Kaneko

Department of Gastroenterology, Kanazawa University Hospital, Kanazawa, Ishikawa, Japan

Aim: Inflammation plays a critical role in cancer. The aim of the present study was to investigate the impact of neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) on patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) treated with hepatic arterial infusion chemotherapy (HAIC).

Methods: We retrospectively evaluated 266 patients with advanced HCC treated with HAIC between March 2003 and December 2012. NLR was calculated from the differential leukocyte count by dividing the absolute neutrophil count by the absolute lymphocyte count.

Results: The cut-off level of NLR was set as the median value of 2.87 among all patients in this study. The objective response rate in the patients with low NLR was 37.6%, which was significantly better than that of the patients with high NLR (21.1%; $P < 0.01$). Multivariate analysis revealed that low NLR remained associated with the response to HAIC ($P = 0.024$). Median progression-free survival and median overall survival

in patients with high NLR were 3.2 and 8.0 months, respectively, which were significantly shorter than that of the patients with low NLR (5.6 and 20.7 months; $P < 0.01$ and $P < 0.01$, respectively). High NLR was an independent unfavorable prognostic factor in multivariate analysis. The patient outcome was stratified more clearly by NLR calculated after HAIC added to calculations before HAIC. Serum platelet-derived growth factor-BB level was positively correlated with NLR.

Conclusion: Results suggest that NLR is a useful predictor in patients with advanced HCC treated with HAIC. These findings may be useful in determining treatment strategies or in designing clinical chemotherapy trials in future.

Key words: hepatic arterial infusion chemotherapy, hepatocellular carcinoma, neutrophil lymphocyte ratio, predictive factor, prognostic factor

INTRODUCTION

HEPATOCELLULAR CARCINOMA (HCC) is the third leading cause of cancer death and remains a worldwide health concern because the incidence of HCC continues to increase globally.¹ A variety of new techniques of imaging modalities have enabled the detection of HCC at early stages, and advances of various therapeutic procedures have improved the curability of patients with HCC.² Despite those recent

advances in diagnostic and therapeutic technologies, the prognosis of patients with HCC remains poor due to impaired liver function and frequent recurrence of HCC.³

Although sorafenib has been established as the standard of care for advanced HCC,⁴ its efficacy and tolerability are limited.⁵ As an alternative therapy to sorafenib, hepatic arterial infusion chemotherapy (HAIC) has been conducted in Asia, including Japan, and it has been reported as a promising treatment procedure.^{6,7} However, application of HAIC and its predictive and prognostic markers have not been fully established.

Inflammation plays a critical role in the development and progression of various cancers.⁸ Inflammation caused by extrinsic factors including a variety of infectious agents and environmental toxins, as well as intrinsic factors including active oncogenes, reactive

Correspondence: Dr Tatsuya Yamashita, Department of Gastroenterology, Kanazawa University Hospital, 13-1 Takara-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-8641, Japan. Email: ytatsuya@m-kanazawa.jp

Conflicts of interest: None to declare.

Received 1 September 2014; revision 3 October 2014; accepted 11 October 2014.

oxygen species and necrosis existing in the cancer tissues, promote various processes of cancer initiation and progression, such as mutation, proliferation, immortalization, invasiveness, angiogenesis, epithelial-mesenchymal transition and immunosuppression.⁹ Additionally, the release of inflammation-related substances is closely related to symptoms such as loss of bodyweight, fatigue and appetite loss among cancer patients. Therefore, inflammation-induced cancer progression and cachectic patient status affect quality of life and patient outcomes.¹⁰ The inflammation-related markers such as absolute white blood cell count, C-reactive protein (CRP), neutrophil to lymphocyte ratio (NLR), platelet to lymphocyte ratio and cytokines have been suggested to be associated with outcomes of patients with various malignancies¹¹ including at an early or intermediate disease stage of HCC.^{12–16} However, whether these markers can serve as biomarkers of treatment efficacies and patient outcome in more advanced stages of HCC remains unclear.

The objectives of the present study were to investigate the correlation between NLR and patient characteristics in advanced HCC patients. We also analyzed the impact of NLR on the treatment efficacies as well as the outcome of patients with advanced HCC treated with HAIC. Moreover, to assess inflammatory molecules associated with NLR, serum level of cytokines and growth factors were measured. This approach provides useful information in determining treatment strategies for patients with advanced HCC.

METHODS

Patients

THE SUBJECTS IN this study were patients treated with HAIC at the Kanazawa University Hospital between March 2003 and December 2012 for advanced HCC with vascular invasion and/or intrahepatic multiple lesions considered unsuitable for surgical resection, locoregional therapy and transarterial chemoembolization. All patients underwent dynamic computed tomography (CT) or dynamic magnetic resonance imaging (MRI) to diagnose HCC and assess the extent of cancer. Additionally, HCC was diagnosed according to the guidelines of the American Association for the Study of Liver Disease.¹⁷ Patients with extrahepatic lesions were also considered eligible for HAIC if their extrahepatic lesions were mild; intrahepatic lesions were considered to be prognostic factors. Other inclusion criteria were Eastern Cooperative Oncology Group performance status (ECOG PS) of 2 or less, appropriate

major organ functions, including bone marrow, kidney, cardiac functions and hepatic function (Child–Pugh A or B), and no clinical symptoms or signs of sepsis.

HAIC

The technique for implantation of the reservoir system has been thoroughly described elsewhere.¹⁸ Catheters were induced through the right femoral artery and angiography from the celiac artery was first performed to localize the HCC and evaluate the intrahepatic and extrahepatic vascularization. Then, we inserted a catheter with a side opening into the gastroduodenal artery, positioning the side opening in the common hepatic artery by an image-guided procedure. The gastroduodenal artery, right gastric artery and other arteries that were suspected to nourish the gastroduodenal region were embolized as much as possible to prevent the gastrointestinal mucositis. The other end of the catheter was connected to the injection port subcutaneously implanted in the right lower abdomen. Finally, we confirmed blood flow redistribution.

Hepatic arterial infusion chemotherapy was conducted approximately 5 days after the reservoir was implanted. The treatment protocol was as follows: all patients received 5-fluorouracil (FU) (330 mg/m² per day) administered continuously for 24 h from day 1 to day 5 and day 8 to day 12, and either interferon (IFN)- α -2b or pegylated (PEG) IFN- α -2b used at the treating physician's discretion. PEG IFN- α -2b (1.0 μ g/kg) was administered s.c. on days 1, 8, 15 and 22, and IFN- α -2b (3×10^6 U) was administered i.m. thrice weekly. Some patients underwent cisplatin administration (20 mg/m² per day) into the hepatic artery for 10 min prior to 5-FU. A treatment cycle consisted of 28 days of drug administration, followed by a 14-day rest period. The treatment was repeated until tumor progression or unacceptable toxicity was observed, or until the patient refused the treatment. The treatment protocol was approved by the ethics Committee of Kanazawa University, and informed consent for participation in the study was obtained from each subject and conformed to the guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki.

Data collection

We reviewed the medical records of the patients, and collected demographic, clinical and laboratory data, including patient age, sex, ECOG PS, history of viral infection, hepatic reserve (Child–Pugh score), imaging data (vascular invasion and extrahepatic lesion) and tumor marker analyses. We collected laboratory data on complete blood count and CRP. The NLR was calculated

from the differential leukocyte count by dividing the absolute neutrophil count by the absolute lymphocyte count. We used the laboratory data obtained within 7 days prior to day 1 of treatment in this study. We also collected NLR values at 4 weeks after the treatment began to evaluate the impact of the NLR trend on patient outcomes. Cytokine and chemokine profiling was obtained as described below:¹⁹ after venous blood was centrifuged at 1580 g for 10 min at 4°C, serum fractions were obtained and stored at -20°C until used. Serum levels of various cytokines and chemokines were measured using the Bio-Plex Protein Array System (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, frozen serum samples were thawed at room temperature, diluted 1:4 in sample diluents, and 50 µL aliquots of diluted sample were added in duplicate to the wells of 96-well microtiter plates containing the coated beads for a validated panel of human cytokines and chemokines according to the manufacturer's instructions. The following 20 cytokines and chemokines were targeted: epidermal growth factor (EGF), basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor, IFN-γ, interleukin (IL)-2, IL-4, tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-6, IL-8, IL-10, IL-5, IFN γ-induced protein (IP)-10, monokine induced by IFN-γ (MIG), platelet-derived growth factor (PDGF)-BB, transforming growth factor (TGF)-β, TGF-α, vascular endothelial growth factor (VEGF), stem cell factor, IL-12 and stromal cell-derived factor 1. Nine standards (range, 0.5–32 000 pg/mL) were used to generate calibration curves for each cytokine. Data acquisition and analysis were performed using Bio-Plex Manager software version 4.1.1 (Bio-Rad).

Evaluation of antitumor effect

The efficacy of HAIC was assessed every 4–6 weeks by dynamic CT or dynamic MRI during the treatment period. The response to chemotherapy was assessed by treating physicians according to the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1.²⁰ An objective response rate was defined as the sum of complete response rate and partial response rate.

Statistical analysis

We compared patient backgrounds according to NLR and patient demographics using the χ^2 -test for categorical variables when appropriate. Student's *t*-test and Mann-Whitney *U*-test were used for continuous variables. We set the cut-off level of continuous variables as the median value among all patients in this study. We divided the patients into two groups according to NLR

before and after treatment, respectively, and compared the response to HAIC and patient outcome between groups. The χ^2 -test was also used to evaluate the relation between NLR and the response to HAIC in univariate analysis. Logistic regression analysis was used for multivariate analysis. Progression-free survival (PFS) was calculated from the first day of HAIC until the date of radiological progression, death or the last day of the follow-up period. Overall survival (OS) was calculated from the first day of HAIC until the date of death or the last day of the follow-up period. To compare PFS and OS between groups, the cumulative survival proportions were calculated using the Kaplan-Meier method, and any differences were evaluated using the log-rank test. Only variables that achieved statistical significance in the univariate analysis were subsequently evaluated in the multivariate analysis using Cox's proportional hazards regression model. Linear regression was used to explore the relationship between cytokine or chemokine profiling and NLR. A *P*-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using the SPSS statistical software program package (SPSS, Chicago, IL, USA).

RESULTS

Patients characteristics stratified by NLR

WE RETROSPECTIVELY LISTED 267 consecutive patients who met the above-described criteria and reviewed their medical records. The information regarding the differential leukocyte count could not be obtained in one patient, and then the remaining 266 patients were analyzed. One hundred and thirty-three (50.0%) of 266 patients had NLR higher than 2.87, the median value among all patients before treatment. Patient demographic characteristics are summarized in Table 1. Patients with high NLR had a significantly worse performance status than those with low NLR (*P* = 0.020). With regard to tumor status, vascular invasion and extrahepatic dissemination were observed more often in the patients with high NLR (57.1% and 27.8%, respectively) than in those with low NLR (39.8% and 18.0%, respectively), and des-γ-carboxyprothrombin (DCP) was higher in the group with high NLR (median, 1286 mAU/mL) than in the one with low NLR (median, 214 mAU/mL). Sorafenib was administered as prior treatment before HAIC in 25 patients (9.4%) and as subsequent therapy after HAIC in 26 patients (9.8%). The proportion of the patients receiving sorafenib before HAIC was similar between the two groups, whereas the proportion of the patients

Table 1 Clinical characteristic of the patients according to NLR

	All (n = 266)	High NLR (n = 133)	Low NLR (n = 133)	P
Age, years				<0.01*
Mean ± SD	66.3 ± 9.1	64.7 ± 9.9	68.0 ± 7.8	
Sex, n (%)				0.30**
Male	209 (78.6)	108 (81.2)	101 (75.9)	
ECOG PS, n (%)				0.020**
0	220 (82.7)	103 (77.4)	117 (88.0)	
1	41 (15.4)	25 (18.8)	16 (12.0)	
2	5 (1.9)	5 (3.8)	0	
Sorafenib before HAIC				0.83**
Present	25 (9.4)	12 (9.0)	13 (9.8)	
Sorafenib after HAIC				0.013**
Present	26 (9.8)	19 (14.3)	7 (5.3)	
HBs antigen, n (%)				0.27**
Positive	70 (26.3)	39 (29.3)	31 (23.3)	
HCV antibody, n (%)				<0.01**
Positive	146 (54.9)	57 (42.9)	89 (66.9)	
Child–Pugh score, n (%)				0.34**
5–6	134 (50.4)	61 (45.9)	73 (54.9)	
7	55 (20.7)	30 (22.6)	25 (18.8)	
8–9	77 (28.9)	42 (31.6)	35 (26.3)	
Vascular invasion, n (%)				<0.01**
Positive	129 (48.5)	76 (57.1)	53 (39.8)	
Extrahepatic lesion, n (%)				0.058**
Positive	61 (22.9)	37 (27.8)	24 (18.0)	
CRP, mg/dL				<0.01*
Mean ± SD	1.9 ± 3.0	2.8 ± 3.8	0.9 ± 1.2	
AFP, ng/mL				0.41***
Median, range	241.5, <10–1 637 200	312.5, <10–745 900	119.5, <10–1 637 200	
DCP, mAU/mL				<0.01***
Median, range	567, <10–1 208 000	1 286, <10–1 208 000	214, <10–326 300	

*Student's *t*-test, ** χ^2 -test, ***Mann–Whitney *U*-test.

AFP, α -fetoprotein; CRP, C-reactive protein; DCP, des- γ -carboxyprothrombin; ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; HBs antigen, hepatitis B surface antigen; HCV antibody, hepatitis C virus antibody; NLR, neutrophil to lymphocyte ratio; SD, standard deviation.

receiving sorafenib after HAIC was higher in the group with high NLR (14.3%) than in the one with low NLR (5.3%) ($P = 0.013$).

Treatment

The data collection cut-off was 20 April, 2014. The median follow-up period was 11.4 months (range, 0.3–127.6). At the time of the analysis, 212 patients (79.7%) had died. A total of 715 courses were administrated to 266 patients, with a median number of two (range, 0–13). All but 18 patients including 12 patients (9.0%) in the high NLR group and six (4.5%) in the low NLR group completed at least one course of HAIC.

Of the 266 patients, IFN- α -2b and PEG IFN- α -2b was used in 131 patients (49.2%) and 135 patients (50.8%),

respectively. The response to HAIC and the patient outcomes were similar between the different IFN groups. Cisplatin was administrated in 186 patients (69.9%). Although response to HAIC had a tendency to be better in patients in the cisplatin group than those of the patients without cisplatin, there was no significant differences of the treatment efficacies.

Response to HAIC and PFS stratified by pretreatment NLR

Of the 266 patients, 15 patients could not receive radiological assessment because of worsened general condition, hepatic failure or loss to follow up, and the remaining 251 were assessable for response to treatment. The tumor responses to HAIC are shown in